

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19099

研究課題名（和文）微生物が潜在的に有するケミカルシグナル応答機構を利用した天然化合物の生産誘導

研究課題名（英文）Enhanced production of natural compounds using the potential chemical signal response mechanisms of micro-organisms

研究代表者

高橋 俊二（Takahashi, Shunji）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：30311608

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：天然化合物は多様な構造と強い生物活性から広く活用されており、微生物に秘められた遺伝子資源を有用化合物資源へと導く手法の開発はポストゲノム時代の重要課題である。放線菌ゲノム中に存在する二次代謝物の生合成遺伝子クラスターを活性化することによって医薬・農薬シーズとなる天然化合物の創出が望まれている。本研究では、微生物二次代謝物の生産を誘導する「ケミカルコミュニケーションシグナル」を活用し、遺伝子改変操作を行わずに、微生物が有する二次代謝物の生産を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物間相互作用に仕組まれているケミカルコミュニケーションシグナルを解明することは、共生の学術的理解に繋がる。二次代謝物生産の潜在能力の開拓、未知遺伝子資源の化合物資源への変換が進展することによって、生命科学・医薬・農業分野への波及が期待される。

研究成果の概要（英文）：Natural products are widely utilized because of their diverse structures and strong biological activities, and the development of methods to convert the genetic resources hidden in microorganisms into useful compound sources is an important issue in the post-genome era. It is desired to create natural products that can be used as seeds for pharmaceuticals and agrochemicals by activating biosynthetic gene clusters of secondary metabolites that exist in the actinomycete genome. In this study, we have utilized "chemical communication signals" to induce the production of microbial secondary metabolites without genetic modification.

研究分野：天然物生合成

キーワード：ケミカルシグナル 微生物二次代謝産物 天然化合物 生産誘導 ーカルボリン 放線菌 転写制御因子 リペロマイシン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌や放線菌などの土壌微生物が作り出す二次代謝産物は医薬シードとして重要である。有用二次代謝産物の生産菌として知られる放線菌からは、抗生物質、抗がん剤、免疫抑制剤、農薬となる化合物群が単離されている。複雑な構造と強い生物活性から、現在でも、微生物代謝産物の重要性は極めて高い。これらの化合物の生産誘導機構を解明し、放線菌ゲノム中に存在する生合成遺伝子クラスターを活性化することによって、医薬・農薬シーズとなる天然化合物を創出することが望まれている。

## 2. 研究の目的

微生物が有する多様な「抗生物質」生産能力は、長い生物間相互作用を経て、進化適応・獲得されたものであるため、本来は微生物の「共生関係を構築する化合物」として機能していたと考えられる。当研究室では、二次代謝物の生産を誘導するケミカルシグナルとして「 $\gamma$ -カルボリン」を見出している。本研究では、放線菌に進化的に組み込まれているシグナル受容機構を活用することによって、遺伝子操作を行わずに天然化合物の生産を誘導する手法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) 最適化合成シグナルの開発: 低濃度の  $\gamma$ -カルボリン化合物(BR-1)を放線菌に添加・培養し、二次代謝産物の生産を確認する。BR-1 は、リベロマイシン(RM)生合成遺伝子クラスターに存在する LAL family 転写制御因子(RevU)に結合することを見出しているが、遺伝子発現機構の詳細は未解明である。また、RevU は、N 末端領域に ATP 結合サイトを持ち、配列に多様性が存在することから様々なシグナルの受容領域と考えられる。標的 DNA への結合誘導が予想されるため、各種阻害剤についてその効果を確認する。また、大腸菌型の人工合成遺伝子を構築し、結晶構造の解析に適した RevU の異種発現・精製を検討する。

(2) BR-1 を用いた新規天然化合物の探索: 有用天然物の探索源である放線菌には、LAL family 転写制御因子群が存在する。そこで、BR-1 およびその誘導体を添加して放線菌を培養し、生産が誘導される二次代謝物を探索する。

## 4. 研究成果

(1)最適化合成シグナルの開発: BR-1 結合による ATP 結合阻害により、RevU 構造を標的 DNA 結合型に誘導する機構を検討するため、人工合成遺伝子を用いて可溶性 RevU 蛋白質を大腸菌で異種発現し、精製効率を改善することに成功した。また、市販の阻害剤を用いて RM 生産誘導を評価した結果、生産性を増強する分子を見出した。

(2)BR-1 を用いた新規天然化合物探索: 独自に土壌より取得した放線菌を用い、BR-1 およびその誘導体を添加して培養したところ、生産誘導される二次代謝産物を複数見出した。次に、化合物取得に向けて大量培養を行い、培養液を各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、目的化合物を得た。現在 NMR 測定を行い、構造を解析している。さらに、BR-1 およびその誘導体により発現が誘導される遺伝子の同定と発現制御機構の解明のために標的放線菌のゲノム解読を行い、候補遺伝子クラスターの情報を取得した。

本研究助成によって、ポストゲノム時代の重要課題である「潜在遺伝子資源の化合物資源化」にむけて多くの新規学術知見を得ることが出来た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Vo Nhu Ngoc Quynh, Nomura Yuhta, Kinugasa Kiyomi, Takagi Hiroshi, Takahashi Shunji	4. 巻 17
2. 論文標題 Identification and Characterization of Bifunctional Drimenol Synthases of Marine Bacterial Origin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suemune Hironori, Nishimura Doukan, Mizutani Kenjiro, Sato Yusuke, Hino Tomoya, Takagi Hiroshi, Shiozaki-Sato Yumi, Takahashi Shunji, Nagano Shingo	4. 巻 593
2. 論文標題 Crystal structures of a 6-dimethylallyltryptophan synthase, lptA: Insights into substrate tolerance and enhancement of prenyltransferase activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 144 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Abdelhakim Islam, Bin Mahmud Fauze, Motoyama Takayuki, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Osada Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 DihydroLucilactaene, a Potent Antimalarial Compound from Fusarium sp. RK97-94	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 63 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsushima Ayako, Narusaka Mari, Gan Pamela, Kumakura Naoyoshi, Hiroyama Ryoko, Kato Naoki, Takahashi Shunji, Takano Yoshitaka, Narusaka Yoshihiro, Shirasu Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 The Conserved Colletotrichum spp. Effector Candidate CEC3 Induces Nuclear Expansion and Cell Death in Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.682155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyama Keisuke, Kato Naoki, Re Suyong, Kinugasa Kiyomi, Watanabe Kohei, Takita Ryo, Nogawa Toshihiko, Hino Tomoya, Osada Hiroyuki, Sugita Yuji, Takahashi Shunji, Nagano Shingo	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular Basis for Two Stereoselective Diels Alderases that Produce Decalin Skeletons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 22401 ~ 22410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202106186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋 俊二、シュレス バンテー、長田 裕之	4. 巻 59
2. 論文標題 放線菌二次代謝物の生産を増強する小分子バイオメディエーター	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 176-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤 直樹, 藤山 敬介, 永野 真吾, 高橋 俊二
2. 発表標題 デカリン合成酵素の阻害剤同定と共結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡村 英治, 佐藤 (汐崎) 裕美, 奥村 英夫, 熊坂 崇, 長田 裕之, 高橋 俊二
2. 発表標題 ReveromycinA合成酵素RevKLMのin silico解析による相互作用予測と実験的検証
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nhu Ngoc Quynh Vo , Yuhta Nomura , Kiyomi Kinugasa , Hiroshi Takagi , Yumi Shiozaki-Sato , Shunji Takahashi
2. 発表標題 Functional characterization of a novel bifunctional drimenol synthase of bacterial origin: A step toward the discovery of drimane sesquiterpenes in bacteria
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yu ZHENG , Hiroshi TAKAGI , Katsuyuki SAKAI , Yumi SHIOZAKI-SATO , Toshihiko NOGAWA , Risa TAKAO , Shunji TAKAHASHI
2. 発表標題 Characterization of cytochrome P450 function in verticilactam biosynthesis
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Islam Adel Abdelhakim Amin , Fauze Mahmud , Motoyama Takayuki , Nogawa Toshihiko , Futamura Yushi , Takahashi Shunji , Osada Hiroyuki
2. 発表標題 Discovery of new lucilactaene derivatives with potent antimalarial activity and their structure-activity relationship
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 俊二
2. 発表標題 放線菌の二次代謝生合成機構と生産性増強に関する研究
3. 学会等名 日本放線菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

天然物生合成研究ユニット  
<http://www.csrs.riken.jp/jp/labs/npbu/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------